

明 細 書

RB1 遺伝子誘導蛋白質 (RB1CC1) 及び遺伝子

5 技術分野

本発明は、癌抑制遺伝子 (レチノブラストーマ遺伝子: RB1 遺伝子) の発現を誘導しうる新規な蛋白質及びポリペプチド (以下新規蛋白質 RB1CC1) に関するものである。さらに詳しくは、新規蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸 (以下 RB1CC1 遺伝子)、該核酸を含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を使ったペプチド又はポリペプチドの製造方法、該ペプチド又はポリペプチドに対する抗体、これらを利用した化合物のスクリーニング方法、該スクリーニングされた化合物、該ポリペプチド若しくは該核酸に作用する活性阻害化合物又は活性賦活化合物、これらに関係する医薬組成物、及びこれらに関係する疾病の検査診断方法並びに試薬に関する。

背景技術

抗がん剤の治療に抵抗性である多剤耐性 (MDR) は癌治療を困難にさせている。MDR の成因は明確ではないが、いくつかの癌では MDR 関連遺伝子 (MDR1 遺伝子) 産物である P-糖蛋白質が関与していると言われている。一方、他の癌では P-糖蛋白質の発現が癌の発生や転移と逆に相関することも知られている。これらの P-糖蛋白質の異なる効果は異なる遺伝子産物の抑制を受けているか或いは異なった相互作用をしていると考えられる。MDR に関連する遺伝子の検索はこれらの現象を解明する上で必須である。

発明の開示

(解決しようとする課題)

- 本発明が解決しようとする課題は、上記のように抗がん剤に対する多剤耐性に関与する遺伝子及びその遺伝子産物を見いだすことである。より具体的には、本発明の課題は癌抑制遺伝子（レチノブラストーマ遺伝子:RB1 遺伝子）の発現を誘導しうる新規な蛋白質及びポリペプチド（新規蛋白質 RB1CC1）を提供することである。また本発明の別の課題は、新規蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部をコードする核酸（以下 RB1CC1 遺伝子）を提供し、遺伝子工学手法による、蛋白質又はポリペプチド（新規蛋白質 RB1CC1）の製造法を提供することである。さらに本発明の別の課題は、新規蛋白質 RB1CC1 由来のポリペプチドに対する抗体を提供することである。その他の本発明の課題は、上記のものを利用して新規蛋白質 RB1CC1 の有する作用の阻害剤・拮抗剤・賦活剤のスクリーニングをおこなうことであり、スクリーニングされた化合物を提供することであり、またこれらを利用した抗がん剤の治療に抵抗性である多剤耐性（MDR）の治療に用いる医薬組成物を提供することである。また別の本発明が解決しようとする課題は、本発明中で明らかになった、癌抑制遺伝子（レチノブラストーマ遺伝子:RB1 遺伝子）の発現を誘導しうる新規の蛋白質及びポリペプチド（RB1CC1 蛋白質）又は該蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部をコードする核酸（以下 RB1CC1 遺伝子）、これを検査することによって癌細胞又は癌の診断方法を提供することである。さらに、該蛋白質のアミノ酸配列の全部又は一部をコードする核酸を増幅しうる核酸プライマーを提供し、該プライマーを用いた核酸の増幅産物を検査することによる癌細胞又は癌の診断方法を提供することである。そして、該蛋白質又はポリペプチド（RB1CC1 蛋白質）と反応しうる抗体を提供することであり、またその抗体を用いた免疫学的

な検査方法を提供する。又本発明の課題は該検査方法に用いられる該プライマー又は該抗体を用いた検査試薬又はキットを提供することでもある。

5 (解決する手段)

課題解決のため、本発明者らは、U-2 OS 骨肉腫細胞と MDR 変異誘導細胞の間で別々に発現されている遺伝子を検索しその塩基配列及び該新規蛋白質の cDNA がコードするアミノ酸配列を決定した。また動物においても同様な蛋白質が存在することを証明するためマウスの新規蛋白質
10 のアミノ酸配列及び該新規蛋白質の cDNA がコードするアミノ酸配列を決定した。さらには、これらの蛋白質を認識する抗体を調製し、遺伝子の発現、変異、欠損等の検査に加えて免疫学的な検討を行い、ある種の癌細胞において本遺伝子の発現及び蛋白質の発現が抑制されていることを見出し、本発明を完成した。

15 すなわち、本発明は以下の構成よりなる。

- 1、ヒト又は動物の細胞の核に存在し、転写因子機能及び／又はレチノブラストーマ遺伝子 (RB1 遺伝子) 或いはその遺伝子産物の発現を誘導しうる機能を有する蛋白質又はポリペプチド。
- 2、上記 1 記載のヒト蛋白質が下記の群より選ばれるポリペプチド又は
20 蛋白質；(1) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又は蛋白質、(2) 前記のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列の少なくとも 5 個のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、(3) 前記のポリペプチド又は蛋白質と少なくとも約 70% のアミノ酸配列上の相
同性を有するポリペプチド又は蛋白質、(4) 及び前記 (1) から (3)
25 のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリペ

プチド又は蛋白質。

- 3、上記 1 記載の動物蛋白質がマウス由来の蛋白質であり、下記の群より選ばれるポリペプチド又は蛋白質；(1) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又は蛋白質、(2) 前記のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列の少なくとも 5 個のアミノ酸配列を含有するポリペプチド、(3) 前記のポリペプチド又は蛋白質と少なくとも約 70% のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は蛋白質、(4) 及び前記 (1) から (3) のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加などの変異あるいは誘発変異を有するポリペプチド又は蛋白質。
- 4、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする核酸又はその相補鎖。
- 5、上記 3 に記載の核酸又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする核酸。
- 15 6、配列表の配列番号 3 ～ 4 に記載の核酸又はその相補鎖の塩基配列のうち少なくとも 15 個の連続した塩基配列で示される核酸であって、該核酸の転写によって発現されるポリペプチドが上記 1 ～ 3 記載のポリペプチドである核酸。
- 7、上記 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸を含有する組換えベクター。
- 20 8、上記 7 の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 9、上記 8 の形質転換体を培養する工程を含む、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の製造方法。
- 10、上記 4 ～ 6 に記載の核酸又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする配列表の配列番号 5 ～ 132 に記載
- 25 の核酸プライマー。
- 11、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質を免疫学的に認識す

る抗体。

- 1 2、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の転写因子活性及び
／又は RB1 遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害もしくは増強する化
合物のスクリーニング方法であって、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド
5 又は蛋白質、上記 1 1 に記載の抗体のうち、少なくともいずれか 1 つを
用いることを特徴とするスクリーニング方法。

- 1 3、上記 4 もしくは 6 に記載の核酸と相互作用して該核酸の発現を阻
害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法であって、上記 4 ～ 6
のいずれか 1 項に記載の核酸、上記 7 に記載のベクター、上記 8 に記載
10 の形質転換体、上記 1 0 に記載の核酸プライマーのうち少なくともいずれ
れか 1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。

1 4、上記 1 2 又は 1 3 に記載のスクリーニング方法でスクリーニング
される化合物。

- 1 5、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の転写因子活性及び
15 ／又は RB1 遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害もしくは増強する化
合物。

1 6、上記 4 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の核酸と相互作用して該核酸の
発現を阻害もしくは増強する化合物。

- 1 7、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質、上記 4 ～ 6 のいず
20 れか 1 項に記載の核酸、上記 7 に記載のベクター、上記 8 に記載の形質
転換体、上記 1 0 に記載の核酸プライマー、上記 1 1 に記載の抗体、又
は上記 1 4 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載の化合物のうち、少なくともい
ずれか 1 つを含有することを特徴とする、抗がん剤の治療に抵抗性であ
る多剤耐性の治療に用いる医薬組成物。

- 25 1 8、上記 1 ～ 3 に記載のポリペプチド又は蛋白質の発現又は活性に関
連した疾病の検査診断方法であって、試料中の (a) 該ポリペプチド又

は蛋白質をコードしている核酸、及び／又は（b）該ポリペプチド又は蛋白質をマーカーとして分析することを含む検査診断方法。

19、癌細胞の検査方法又は癌の診断方法である上記18の検査診断方法。

5 20、上記11に記載の抗体を用いることを特徴とする、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質の全部又は一部の発現、増加、減少、欠損等を検査する上記18又は19に記載の方法。

21、上記10に記載の核酸プライマーの少なくとも何れかの1つを用いて上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子を増幅させる工程を経て、上記1～3に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子の全部又は一部の発現、変異、欠損又は挿入等を検査する上記18又は19に記載の方法。

22、癌抑制遺伝子レチノブラストーマ遺伝子（RB1遺伝子）或いはその遺伝子産物（RB1蛋白質）の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、
15 欠損又は挿入等を検査することを組み合わせることを特徴とする上記18～21に記載の方法。

23、多剤耐性遺伝子、（MDR1遺伝子）の或いはその遺伝子産物（MDR1蛋白質：P-糖蛋白質）の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、欠損又は挿入等を検査することを組み合わせることを特徴とする上記18～
20 22に記載の方法。

24、細胞増殖マーカー、Ki-67蛋白質、の全部又は一部の発現、増加、減少等を検査することを組み合わせることを特徴とする上記18～23に記載の方法

25、上記23記載の方法を用いる癌細胞の薬剤感受性を検査する方法。

26、上記18～25に記載の方法に用いる検査診断試薬及びキット。

図面の簡単な説明

第 1 図は、ヒト RB1CC1 遺伝子と MDR1 遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

第 2 図は、ヒト RB1CC1 蛋白質が核に存在していることを示すウエスタンブロットと細胞の免疫染色の写真である。

第 3 図は、マウス Rb1cc1 蛋白質が核に存在していることを示すウエスタンブロットと細胞の免疫染色の写真である。

第 4 図は、抗癌剤ドキソルビシン処理による細胞増殖の効果を調べた図である。

10 第 5 図は、抗癌剤ドキソルビシン処理による細胞増殖と RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

第 6 図は、各種癌細胞における RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現の関連を調べた RT-PCR 産物の電気泳動写真である。

15 第 7 図は、ヒト各種臓器における RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

第 8 図は、マウス各種臓器における RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現の関連を調べたノーザンブロットの写真である。

第 9 図は、RB1CC1 遺伝子導入による RB1 遺伝子発現効果を調べた
20 RT-PCR 産物の電気泳動写真である。

第 10 図は、RB1 遺伝子プロモーター領域の転写活性に及ぼす RB1CC1 遺伝子誘導の効果を調べた結果の図である。

第 11 図は、各種の原発性乳癌における RB1CC1 遺伝子ローカスのヘテロ接合性の消失の検査結果の写真である。

25 第 12 図は、原発性乳癌における RB1CC1 遺伝子の変異を調べた RT-PCR 産物の電気泳動の写真と遺伝子配列解析結果の図である。

第 1 3 図は、原発性乳癌における RB1CC1 蛋白質と RB1 蛋白質の発現を調べたウエスタンブロットの写真である。

第 1 4 図は、原発性乳癌における RB1CC1 蛋白質と RB1 蛋白質の発現を調べた免疫組織染色の写真である。

- 5 第 1 5 図は、染色指標の RB1CC1 と、Ki-67 及び RB1 との相関を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

(新規蛋白質 RB1CC1)

- 10 本発明において提供される新規蛋白質 RB1CC1 をコードする核酸は、U-2 OS 骨肉腫細胞と MDR 変異誘導細胞の間で別々に発現されている遺伝子を検索し、配列表・配列番号 5 ～ 3 7 に記載の核酸プライマーを用いて、U-2 OS mRNA を鋳型として増幅し、その塩基配列及び該新規蛋白質の cDNA がコードするアミノ酸配列を決定し、新規なアミノ酸配
- 15 列を有する物質として、その cDNA が取得されたものである。本発明の新規蛋白質 RB1CC1 の cDNA は、6.6-kb の長さを持ち、4782 ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム (ORF) を含み、分子量 180kDa の 1594 個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。

- 20 ヒト新規蛋白質 RB1CC1 はコンセンサス核局在シグナル配列部位 (リジン-プロリン-アルギニン-リジン配列: KPRK)、ロイシンジッパーモチーフ配列部位及びコイル-コイル構造を有していた。ヒト新規蛋白質 RB1CC1 は DNA 結合転写機能を持つことが示唆された。

(マウス新規蛋白質 Rb1cc1)

- 25 マウス筋肉の mRNA を鋳型にして配列表の配列番号 5 3 ～ 8 3 に記載の核酸プライマーを用いて増幅・解析した。得られたマウス新規蛋白質

質 Rb1cc1 をコードする cDNA は 6518bp の鎖長であり、1588 アミノ酸をコードしている 4764bp のオープンリーディングフレーム (ORF) を持っていた。マウス新規蛋白質 Rb1cc1 の遺伝子はヒト新規蛋白質 RB1CC1 遺伝子と 89% の相同性を持っていた。マウス新規蛋白質 Rb1cc1 もヒトと同様コンセンサス核局在シグナル配列部位 (リジン-プロリン-アルギニン-リジン配列: KPRK)、ロイシンジッパーモチーフ配列部位及びコイル-コイル構造を有していた。マウス新規蛋白質 Rb1cc1 も DNA 結合転写機能を持つことが示唆された。

10 (新規蛋白質及び遺伝子の機能)

MDR における本発明の RB1CC1 遺伝子の役割を調べるために、親細胞 U-2 OS 細胞、MDR に変異した細胞 (U-2 OS/DX580) と MDR1 遺伝子を導入した U-2 OS 細胞 (U-2/DOXO35) に対してドキソルビシン (doxorubicin) 処理をした場合の RB1CC1 遺伝子の発現を比較したところ、親細胞 U-2OS 細胞と遺伝子導入コントロール細胞 (U-2/Neo8) において、ドキソルビシン (doxorubicin) は RB1CC1 遺伝子の発現を低下させ、細胞死を誘導した。対照的に、MDR に変異した細胞においてはドキソルビシン (doxorubicin) 処理は RB1CC1 遺伝子の発現レベル、細胞生存期間又は細胞増殖に抑制効果を示さず、MDR1 遺伝子を有する細胞では RB1CC1 遺伝子の発現を増加させた。これらの細胞では RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現が相関し、両遺伝子の発現はこれらの細胞の増殖を持続させた。

本発明の RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現の関係を調べるために、U-2 OS ヒト骨肉種細胞の 5 種の MDR への変異株と 24 種のヒト腫瘍細胞 (10 種の骨肉種、4 種の肺癌、7 種の乳癌、3 種の血液癌) での両遺伝子の発現を調べたところ、全ての細胞で RB1CC1 遺伝子の発現は RB1

遺伝子の発現と強く相関した。非腫瘍組織のノーザンブロット解析においても RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現は同様な相関を示した。

さらに、K562 細胞とジャーカット (Jurkat) 細胞において本発明の RB1CC1 遺伝子の外来性発現は RB1 遺伝子発現を増加させた。MDR1 5 遺伝子の発現はこれらの細胞では検出できなかった。RB1CC1 遺伝子の誘導は RB1 遺伝子のプロモーターの転写活性も刺激した。RB1CC1 遺伝子の導入は RB1 遺伝子のプロモーターの刺激活性を通じて RB1 遺伝子の発現を上昇させた。

新規蛋白質 RB1CC1 のアミノ酸配列、その核局在性及びその発現パターンから、本発明の RB1CC1 遺伝子は分子中間体を通して直接或いは間 10 接的に、RB1 遺伝子発現を増強させる転写因子である可能性がある。ヒト及びマウス由来 RB1 遺伝子のプロモーター配列の解析から Sp1 や ATF のような構成転写因子が存在する可能性は示されているが、RB1 遺伝子発現を直接制御する転写因子は知られていない。約 80% のヒトの 15 癌においては RB1 遺伝子経路に存在する分子がその発癌機構に関連しており、RB1 遺伝子の制御不能が多くの人の癌に重要な役割をしている。

本発明のヒト及びマウスの RB1CC1 遺伝子は表 1 に示すようにヒトでは 74kb、マウスでは 57kb 以上の長さを有している 24 のエキソンと 23 個のイントロンから構成されている。そしてエキソン 3 の部位に翻 20 訳開始箇所がある。マウスにおけるこの遺伝子構造は、配列表・配列番号 84~132 に記載のプライマーを用いて明らかにした。この遺伝子の染色体上の局在部位を調べたところ、ヒトでは第 8 染色体上の 8q11.2 に、マウスでは第 1 染色体の 1A2-4 に存在していることがわかった。

(表 1)

表1 RB1CC1 遺伝子の構造

エキソン				イントロン				ヒトの配列			
番号	核酸鎖長 (bp)	番号	核酸鎖長 (kb)	ヒト	マウス	ヒト	マウス	スプライシング受容配列	スプライシング供与配列		
ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	スプライシング受容配列	スプライシング供与配列		
1	358	296	1	9.1	11.2				GGTTGCCGG	gtaagtgtcg	
2	115	110	2	1.3	1.8	tcctttccag	TTTTCTGAGT		GTGCTGACG	gtaagtcaca	
3	122	115	3	1.4	3.5	ttctctctag	TAACTGTATC		CAGTGCAAC	gtaagttgta	
4	127	127	4	0.2	0.1	ttttttgaag	TGTGGCAGC		TGCTGGGACG	gtaggtattc	
5	171	171	5	7.0	3.8	aaaaatatag	GATACAAATC		GCTTGCAATG	gtaagatata	
6	203	203	6	2.1	1.3	ttcaatatag	GAATGTATG		AACTTACTCA	glatgtttgc	
7	430	427	7	5.7	3.8	glattttaag	TTTAGGAACT		TATGAGCAGG	gtaagtaacg	
8	171	171	8	6.3	0.5	tgatcatttag	CTTGATCCAA		GCTTGCTCAG	gtacctattt	
9	185	185	9	0.3	0.2	tttctcaag	GGATTTTATG		TCAGACTGAA	gtaagtgaat	
10	187	187	10	0.1	0.1	tattctctag	GTGGTGTTCG		CTACAGGAG	glatgcaagt	
11	82	82	11	0.3	0.1	ccctctctag	TGGGCTGGTG		AAATTATTA	glaagtgttc	
12	62	62	12	1.6	1.6	ctttatacag	GGAGTCTT		TTCCTTTGT	glatgtattt	
13	104	104	13	0.8	0.3	tttggatcacg	ACTCAAAAGC		CATTCCTCAG	glaaatgtca	
14	127	127	14	0.1	0.1	tctgatttcag	GGTTCCTTA		TGAACAAAG	gcaaattcaa	
15	1901	1892	15	10.1	10.0	tgttttccag	GCATCTGTGA		TAGCAAAAG	glaagaatta	
16	168	166	16	2.9	1.8	aatttgttaag	TCCTGCCATT		GGACAAACAG	gtctgtatct	
17	109	109	17	0.1	0.1	cttggtccag	ACCAATTTA		CGGGATAAAG	glltctactz	
18	241	241	18	6.3	1.1	tgctcttcag	ATTGTATAGA		TGCTGTACA	glaagtatgg	
19	55	49	19	1.0	1.0	tcacttttag	AGAAATATT		GTTAGAACGA	glaagtaaat	
20	48	48	20	4.4	3.0	ccacctcag	ACATTGCAAT		TCAAAGACTG	glaagatttt	
21	59	59	21	2.3	2.1	tttttttag	ATGCTCAGA		CTATTAGAGA	glaagatttt	
22	137	137	22	3.5	2.0	cttltattcag	TTTTCAGGTG		GGTGAGGGTG	glaagtgta	
23	71	71	23	0.8	1.6	atttcatttag	CTTCAGGTGC		AGCCAAAAG	glaaaaacga	
24	1401	1379				tcctctctag	GCACAAAACA				

エキソン配列は大文字で、イントロン配列は小文字で示した。

11/1/ 11.

本発明の RB1CC1 遺伝子の変異を検出するために、35 例の原発性乳癌から調製した cDNA を用いて RB1CC1 遺伝子を解析したところ、7 例の癌で 9 種類の変異を確認した。9 種類全ての変異はエキソン 3 - 2 4 での抜け落ちの存在であり、断片化した新規蛋白質 RB1CC1 はコンセンサス核局在シグナル配列部位、ロイシンジッパーモチーフ配列部位及びコイルーコイル構造が失われており、基本的な新規蛋白質 RB1CC1 の機能がないものであった。

2 例の原発乳癌 (MMK3 と 6) では両方の対立遺伝子において複数のヘテロ接合体の抜け落ちがあり、抜け落ちを持つ RB1CC1 遺伝子からは明らかに断片化された新規蛋白質 RB1CC1 が得られることが予測される。MMK6 ではエキソン 3 - 2 4 (ヌクレオチド、534-5322) とエキ

15

20

25

ソン 9-23 (ヌクレオチド、1757-5187) での抜け落ちがあり、コドン 4 と 411 でそれぞれフレームシフトをしていた。MMK3 においては、エキソン 3-24 (ヌクレオチド、535-5324) とエキソン 5-11 (ヌクレオチド、849-2109) での抜け落ちがあり、前者ではコドン 4 での終止が起こり、後者ではコドン 109 でのフレームシフトを引き起こし 122 アミノ酸の断片蛋白が得られる結果になっていた。癌試料のゲノム DNA の PCR ではそれぞれの抜け落ち変異に対応する変則な生成物が検出されたのに対して、胚細胞 DNA では変異が認められないことから、これらの変異は体細胞で見出されるものである。これらの癌では新規蛋白質 RB1CC1 が検出されず、そして RB1 蛋白質が MMK6 では欠如しており、MMK3 では優位に減少していた。両方とも染色体の RB1 ローカスでのヘテロ接合性の消失はなかった。一方、RB1CC1 遺伝子の変異がない癌試料 (MMK12 と 29) では新規蛋白質 RB1CC1 と RB1 蛋白質の両方が存在していた。このことは RB1CC1 遺伝子の不活性化変異は RB1 遺伝子の発現を不十分にし、RB1 遺伝子経路の制御不能を促進し、そして癌発生を引き起こすことが示唆される。

5 例の他の乳癌 (MMK1、15、31、38 及び 40) においても、機能を持たない断片蛋白質を生成する RB1CC1 遺伝子内での抜け落ちを検出した。これらの変異は全てヘテロ接合体であったが、RB1CC1 ローカスでのヘテロ接合性の消失も存在しており、すべてのケースで RB1CC1 遺伝子の発現もないことより、両方の対立遺伝子で機能消失が起きていることが示唆された。これらの癌において RB1 蛋白質の発現が RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の変異がないケース (MMK12 と 29) に比較して明らかに減少していた。これらの 5 例 (MMK1、15、31、38 及び 40) では RB1 ローカスでのヘテロ接合性の消失は認められなかった。

本発明の RB1CC1 遺伝子のホモ接合不活性化は乳癌の発生に関連し

ている。調べた原発乳癌の約 20%において、明らかに機能を持たない断片の新規蛋白質 RB1CC1 を生成する RB1CC1 遺伝子の抜け落ち変異が認められた。これらの癌の 2 例は RB1CC1 遺伝子内部での複数のヘテロ接合の抜け落ちであり、残りは RB1CC1 遺伝子のヘテロ接合性の消失であった。7 例全てで新規蛋白質 RB1CC1 は検出できないが、RB1CC1 遺伝子の変異のない癌では蛋白質が発現されていた。RB1 蛋白質は RB1 ローカスでのヘテロ接合の消失がないにも拘わらず、7 例全てで存在しないか又は有意に減少していた。

新規蛋白質 RB1CC1 は RB1 遺伝子の発現を増加させる方向に制御しており、乳癌において RB1CC1 遺伝子は腫瘍抑制因子として働いている。そして、RB1CC1 遺伝子の異常・不活化は、RB1 遺伝子の発現低下をもたらし、癌の発生・進行を引き起こす。

上述のように RB1CC1 遺伝子及び蛋白質の発現が RB1 遺伝子の発現と相関していることから、本発明の RB1CC1 遺伝子及び蛋白質検査を RB1 遺伝子の発現又は蛋白質の発現と組み合わせて検査することによってより有用な癌細胞又は癌の診断方法が提供される。

さらに多剤耐性遺伝子 (MDR1) 又は蛋白質と組み合わせる検査によって、薬剤の癌又は癌細胞に対する効果を調べることができ、抗癌剤の選択、効果の予測に有用な検査方法又は診断方法が提供される。

20

(ポリペプチド又は蛋白質)

本発明の新規蛋白質は、配列表の配列番号 1 又は 2 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド又は蛋白質である。さらに本発明のポリペプチド又は蛋白質は、この配列表の配列番号 1 又は 2 に示すポリペプチドの部分配列を有するポリペプチドから選択される。その選択されるポリペプチドは、配列表の配列番号 1 又は 2 に示すポリペプチドと、好ましく

25

は約 70%以上、より好ましくは約 80%以上、さらに好ましくは約 90%をこえる相同性を有する。この相同性をもつポリペプチドの選択は、例えば RB1 遺伝子又は RB1 蛋白質の発現を指標にして行うことができる。

- アミノ酸配列の相同性を決定する技術は、自体公知であり、例えばア
- 5 ミノ酸配列を直接決定する方法、推定される核酸の塩基配列を決定後これにコードされるアミノ酸配列を推定する方法等を使用することができる。

- 本発明のポリペプチドは、配列表の配列番号 1 又は 2 に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド又は蛋白質の部分配列を有するポリペプチド
- 10 から選択されるアミノ酸配列を試薬・標準物質・免疫原として利用できる。その最小単位としては、少なくとも約 5 個以上、好ましくは少なくとも約 8～10 個以上、さらに好ましくは少なくとも約 11～15 個以上のアミノ酸で構成されるアミノ酸配列からなり、免疫学的にスクリーニングしうるポリペプチドを本発明の対象とする。

- 15 さらに、このように特定されたポリペプチドをもとにして、RB1 遺伝子又は RB1 蛋白質の発現を指標とすることにより、1 ないし数個のアミノ酸の欠失・置換・付加などの変異あるいは誘発変異を有するアミノ酸配列からなるポリペプチドも提供することができる。欠失・置換・付加あるいは挿入の手段は自体公知であり、例えば Ulmer の技術 (Science,
- 20 219:666, 1983) を利用することが出来る。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基もしくはカルボキシル基などを修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

- 本発明のポリペプチドは、それら自体で、新規蛋白質 RB1CC1 の機能を制御するための医薬組成物に使用できる。また、本発明のポリペプチ
- 25 ド又は蛋白質は、新規蛋白質 RB1CC1 の機能を制御しうる化合物、例えば、阻害剤、拮抗剤、賦活剤等を得るためのスクリーニングや、新規蛋

白質 RB1CC1 に対する抗体の取得に用いることができる。さらに、本発明のポリペプチド又は蛋白質は、試薬・標準品としても使用可能である。

(核酸)

- 5 本発明の核酸及びその相補鎖は、配列表の配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列をコードする、配列表の配列番号 3 又は 4 に記載の核酸及び該核酸に対する相補鎖、これらの核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする核酸、及びこれらの核酸のうち少なくとも 15 個の連続した塩基配列を有しかつコードするペプチドが新規蛋白質
- 10 RB1CC1 に対する抗体と結合能を有する核酸を意味する。核酸として DNA を代表例にとると、「DNA にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA」とは、自体公知の方法で例えば *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) に記載の方法によって得ることができる。ここで、「ストリンジェントな
- 15 条件下でハイブリタイズする」とは、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 及び $50\% \text{ホルムアミド}$ の溶液中で 42°C にて加温した後、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ の溶液中で 68°C にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリタイズのシグナルが観察されることを表す。

- 本発明の核酸は、配列表の配列番号 1 又は 2 に記載のアミノ酸配列を
- 20 コードする、配列表の配列番号 3 又は 4 の核酸の情報から選択される相同鎖及び相補鎖を意味し、指定されたヌクレオチド配列の領域に対応する少なくとも約 15~20 個以上の配列からなる核酸配列及び該相補鎖を意味する。この有用な核酸配列の決定は、公知の蛋白質発現系、例えば無細胞蛋白質発現系を利用して簡易に発現蛋白質の確認を行い、その生
- 25 理活性新規蛋白質 RB1CC1 に対する抗体との結合性を指標にして選別することにより行うことができる。無細胞蛋白質発現系としては、例え

ば胚芽、家兎網状赤血球等由来のリボソーム系の技術を利用できる (Nature, 179, 160~161, 1957)。

- これらの核酸は、いずれも本発明の新規蛋白質 RB1CC1 及び本発明のポリペプチド又は蛋白質の製造に有用な遺伝子情報を提供するものであり、これらをコードする遺伝子等の核酸、又は mRNA 検出のためのプローブもしくはプライマーとして、あるいは遺伝子発現を制御するためのアンチセンスオリゴマーとして使用することができる。さらに、本発明の核酸は、核酸に関する試薬・標準品としても利用できる。

10 (形質転換体)

上記のような無細胞蛋白質発現系以外にも、大腸菌、酵母、枯草菌、昆虫細胞、動物細胞等の自体公知の宿主を利用した遺伝子組換え技術によって、本発明からなる新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを提供可能である。

- 15 形質転換は、自体公知の手段を応用することができ、例えばレプリコンとして、プラスミド、染色体、ウイルス等を利用して宿主の形質転換を行う。より好ましい系としては、遺伝子の安定性を考慮するならば、染色体内へのインテグレート法があげられるが、簡便には核外遺伝子を用いた自律複製系を利用する。ベクターは、宿主の種類により選択され、
- 20 発現目的の遺伝子配列と複製そして制御に関する情報を担持した遺伝子配列とを構成要素とする。構成要素は宿主が原核細胞か真核細胞かによって選択し、プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター、シグナル配列、エンハンサー等を自体公知の方法によって組み合わせて使用する。
- 25 形質転換体は、自体公知の各々の宿主の培養条件に最適な条件を選択して培養することにより、本発明のポリペプチドの製造に用いることが

できる。培養は、発現産生される新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドの生理活性、特に RB1 遺伝子誘導活性又は DNA 結合性転写因子活性を指標にして行ってもよいが、培地中の形質転換体量を指標にして継代培養又はバッチによって行う。

5

(新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物の回収)

培地からの新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドの回収は、新規蛋白質 RB1CC1 に対する抗体との結合性を指標にして、分子篩、イオンカラムクロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラ
10 フィー等を組み合わせるか、溶解度差にもとづく硫酸、アルコール等の分画手段によっても精製回収できる。

(抗体)

抗体は、本発明の新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペ
15 プチドの抗原決定基を選別し、作成する。抗原決定基は、少なくとも 5 個、より好ましくは少なくとも 8～10 個のアミノ酸で構成される。このアミノ酸配列は、必ずしも配列表の配列番号 1 又は 2 と相同である必要はなく、蛋白質の立体構造上の外部への露出部位であればよく、露出部位が不連続部位であれば、該露出部位について連続的なアミノ酸配列で
20 あることも有効である。抗体は、免疫学的に新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを認識する限り特に限定されない。この認識の有無は、公知の抗原抗体結合反応によって決定する。

抗体を産生するためには、本発明の新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを、アジュバントの存在又は非存在下で、単
25 又は担体に結合して、動物に対して体液性応答及び／又は細胞性応答等の免疫誘導を行う。担体は、自身が宿主に対して有害作用をおこさなけ

れば特に限定されず、例えばセルロース、重合アミノ酸、アルブミン等が例示される。免疫する動物としては、マウス、ラット、兎、やぎ、馬等が好適に用いられる。ポリクローナル抗体は、自体公知の血清からの抗体回収法によって取得する。

- 5 モノクローナル抗体を生産するためには、上記の免疫手段が施された動物から抗体産生細胞を回収し、自体公知の永久増殖性細胞への形質転換手段を導入することによって行われる。

- ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体は、直接本発明からなる新規蛋白質 RB1CC1 と結合し、その活性を制御可能であり、新規蛋白質
- 10 RB1CC1 と RB1 遺伝子又は蛋白質の発現の制御を容易に行うことができる。そのため、RB1 遺伝子産物と新規蛋白質 RB1CC1 が関連する疾患の治療・予防のために有用である。

(スクリーニング)

- 15 かくして調製された新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチド、これらをコードする核酸及びその相補鎖、これらのアミノ酸配列及び塩基配列の情報に基づき形質転換させた細胞、並びに新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、単独又は複数手段を組み合わせることによって、新規蛋白質
- 20 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドとの結合性、新規蛋白質 RB1CC1 の機能、又は新規蛋白質 RB1CC1 の発現に対する阻害剤もしくは賦活剤のスクリーニングに有効な手段を提供する。すなわち、本発明のポリペプチド、本発明の抗体の少なくともいずれか1つを用いることで、本発明のポリペプチド又は蛋白質と RB1 遺伝子又は蛋白質の発
- 25 現を阻害もしくは増強する化合物を得るためのスクリーニング方法が、本発明の核酸、本発明のベクター、本発明の形質転換体、本発明の抗体

の少なくともいずれか1つを用いることで本発明の核酸と相互作用し該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法が、本発明のポリペプチド又は蛋白質、本発明の抗体の少なくともいずれか1つを用いることで本発明のポリペプチド又は蛋白質の RB1 遺伝子又は蛋白質の発現制御機能を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法が提供可能である。例えば、ポリペプチドの立体構造に基づくドラッグデザインによる拮抗剤の選別、蛋白質発現系を利用した遺伝子レベルでの発現調整剤の選別、抗体を利用した抗体認識物質の選別等が、自体公知の医薬品スクリーニングシステムにおいて利用可能である。

10

(化合物、医薬組成物)

上記のスクリーニング方法で得られた化合物は、新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドの RB1 遺伝子又は蛋白質の発現制御機能を調節する阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物として利用可能である。また、遺伝子レベルでの新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドの発現に対する阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物としても利用可能である。上記の阻害剤、拮抗剤、賦活剤等の候補化合物としては、蛋白質、ポリペプチド、抗原性を有さないポリペプチド、低分子化合物等が挙げられ、好ましくは低分子化合物である。

かくして選別された候補化合物は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することによって、骨肉腫、白血病、更に、乳腺、前立腺、肺、及び大腸由来の腫瘍等の治療に用いる医薬組成物として調製可能である。また、本発明からなる新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチド、これらをコードする核酸及びその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター並びに、新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、それら自体が、新

25

規蛋白質 RB1CC1 と RB1 遺伝子産物との相互作用に対する阻害・拮抗・賦活等の機能を有する、乳癌、前立腺癌等の治療に用いる医薬手段として使用できる。ここで、乳癌、前立腺癌等とは、良性腫瘍ならびに悪性腫瘍を含み、なお、製剤化にあたっては、自体公知のポリペプチド、蛋白質、核酸、抗体等、各対象に応じた製剤化手段を導入すればよい。

本発明からなる新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチド、これらをコードする核酸及びその相補鎖、これらの塩基配列を含むベクター並びに、新規蛋白質 RB1CC1 及びその由来物からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体は、本発明のポリペプチドの発現又はその活性が関連する疾患、例えば、本発明の新規蛋白質 RB1CC1 の発現又は RB1 遺伝子又はその産物との相互作用に関連した疾患等の検査診断方法として使用することができる。特に、乳癌、前立腺癌等の診断マーカー及び／又は試薬等の検査診断方法として有用である。診断は、新規蛋白質 RB1CC1 をコードしている核酸配列との相互作用・反応性を利用して、相応する核酸配列の存在量を決定すること、及び／又は新規蛋白質 RB1CC1 について生体内分布を決定すること、及び／又は新規蛋白質 RB1CC1 の試料中での存在量を決定することによって行う。詳しくは、新規蛋白質 RB1CC1 を診断マーカーとして検定する。その測定法は、自体公知の抗原抗体反応系、酵素反応系、PCR 反応系等を利用すればよい。さらに、検査診断の方法に用いる試薬キットなども含まれる。

(実施例)

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

(実施例 1 ヒト RB1CC1 の cDNA)

MDRに関連する遺伝子を同定するために、U-2 OS骨肉腫細胞とMDR変異誘導細胞の間で別々に発現されている遺伝子を検索し新規ヒト遺伝子を同定した。配列表の配列番号5と26のプライマー対(CC1-S1及びCC1-AS1)及び配列番号6と25のプライマー対(CC1-S2及びCC1-AS2)を用いてクローニングし、更に配列番号7～24のプライマーを使ってその核酸配列を決定した。また、市販のcDNA末端配列迅速増幅キット(RACEキット、ロッシュ社製)を用い、配列番号27～37のプライマーを使って、5'末端及び3'末端cDNAの配列を同定した。DNAとそのコードされるアミノ酸配列はDNAsis ver.3.2 シーケンスアナライザー(日立ソフトウェア製)とPSORT II (<http://www.yk.rim.or.jp/~aisoai/molbio-j.html>)を用いて解析した。その結果、そのcDNAは、6.6-kbの長さを持ち、4782ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム(ORF)を含み、180kDaの分子量で1594個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしていた。

15

(実施例2 マウス Rblcc1 の cDNA)

マウス筋肉のmRNAを鋳型にRT-PCR法を用いて増幅させ、配列表の配列番号53と73のプライマー対(MCC1-S1及びMCC1-AS1)及び配列番号54と72のプライマー対(MCC1-S2及びMCC1-AS2)を使ってクローニングした。そして更に配列表・配列番号55～71のプライマーを使ってその核酸配列を決定した。また、配列表の配列番号74～77のプライマー(MCC-ASR1、MCC-ASR2、MCC-ASR3及びINTRON1ASR)を5'末端RACE用プライマー、配列番号78～83のプライマー(MCC-SR1、MCC-SR2、MCC3-S3、MCC3-S4、MCC3-AS2及びMCC3-AS3)を3'末端RACE用プライマーとしてcDNAの迅速増幅を行った以外は実施例1と同様に操作してマウス新規蛋白質 Rblcc1

25

の cDNA を同定した。マウス新規蛋白質 Rb1cc1 をコードする cDNA は 6518bp の鎖長であり、1588 アミノ酸をコードしている 4764bp のオープンリーディングフレーム (ORF) を持っている。マウス新規蛋白質 Rb1cc1 の遺伝子はヒト新規蛋白質 RB1CC1 遺伝子と、核酸レベルにて
5 86%、蛋白レベルにて 89% の相同性を持っていた (配列番号 1 ~ 4 参照)。

(実施例 3 本発明の RB1CC1 遺伝子と MDR1 遺伝子の分析)

親細胞 U-2 OS 細胞と数種の MDR 変異細胞における RB1CC1 遺伝子と MDR1 遺伝子の発現レベルをノーザンブロットで解析した。RB1CC1
10 遺伝子の解析用プローブは RB1CC1 遺伝子配列のヌクレオチド番号 4190~4654 の間にハイブリダイズするものを用い、MDR1 遺伝子には MDR1 遺伝子のヌクレオチド番号 834~1119 にハイブリザイズするプローブを用いた。プローブはデオキシシトシン-3-リン酸の α 位のリンを放射性同元素に置換した α -32P-dCTP でラベルして用いた。グリセロールデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を mRNA 発現の指標として用
15 いた。その結果両遺伝子の発現レベルは逆相関した (第 1 図)。

(実施例 4 抗体の調製とウエスタンブロット解析)

本発明の新規蛋白質 RB1CC1 のアミノ酸配列 642~658 (RB1CC-642)、
20 744~757 (RB1CC-744) 及び 1104~1118 (RB1CC-1104) の 3 種類の合成ポリペプチドを調製し、それぞれのポリペプチドのアミノ末端にシステイン残基を導入したものを、ウサギに通常の方法で免疫し抗体を得た。U-2 OS 細胞の核成分と細胞質成分をそれぞれ SDS-PAGE 後、調製した抗体を用いてウエスタンブロットによる解析を行った。その結果、
25 分子量 180kDa の RB1CC1 蛋白質が核に存在していることが示された (第 2 図)。

マウス NIH3T3-3 細胞の核成分と細胞質成分を同様に電気泳動後、RB1CC-642 抗体を用いてウエスタンブロット解析した。同時に抗スタスミンウサギ抗体を用いてスタスミンの検出も行った。その結果、Rb1cc1 蛋白質は核に局在し、スタスミンは細胞質に存在していることが示された。さらに同細胞を各抗体による免疫細胞染色を行い比較したところ、RB1CC-642 抗体では核が染色され、一方抗スタスミンウサギ抗体では細胞質が染色された（第 3 図）。5

以上の結果、本発明の新規蛋白質 RB1CC1 は哺乳動物細胞の核に存在することが示された。

10

（実施例 5 本発明の RB1CC1 遺伝子の発現に対する抗癌剤の効果）
親細胞（U-2 OS）、MDR に変異した細胞（U-2 OS/DX580）と MDR1 遺伝子を導入した U-2 OS 細胞（U-2/DOXO35）に対してドキソルビシン（doxorubicin）処理をした 4 種の細胞について、抗癌剤の影響を調べた。抗癌剤ドキソルビシン（doxorubicin）、450ng/mL の存在下での細胞増殖の影響を調べた。その結果、第 4 図に示すように親細胞 U-2 OS 細胞と遺伝子導入コントロール細胞（U-2/Neo8）では抗癌剤によって細胞増殖が抑えられるのに対して、MDR に変異した細胞（U-2 OS/DX580）と MDR1 遺伝子を導入した U-2 OS 細胞（U-2/DOXO35）の場合には抗癌剤の効果はなく細胞増殖が 120 時間以上続いた（第 4 図）。15
20

上記の実験で得られた各経時的に得られた細胞の mRNA 発現レベルの解析を行った。本発明の新規遺伝子 RB1CC1 遺伝子、RB1 遺伝子及び MDR1 遺伝子を、RB1 遺伝子の発現レベルをヒト RB1 mRNA のヌクレオチド配列 336～675 の部位にハイブリダイズするプローブを用いて検出した以外は実施例 3 と同様にそれぞれ解析した。その結果を第 5 図に示した。抗癌剤の効果が認められた親細胞 U-2 OS 細胞と遺伝子導入25

コントロール細胞 (U-2/Neo8) では、経時的に RB1CC1 遺伝子の発現が低下していた。対照的に、MDR に変異した細胞 (U-2 OS/DX580) と MDR1 遺伝子を導入した U-2 OS 細胞 (U-2/DOXO35) 細胞においてはドキシソルビシン (doxorubicin) 処理によって RB1CC1 遺伝子の発現レベルは抑制されず、RB1CC1 遺伝子の発現が増加した。これらの細胞では RB1CC1 遺伝子の発現と RB1 遺伝子の発現が相関していた (第 5 図)。

(実施例 6 本発明の RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現)

種々の癌細胞における RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現を半定量 RT-PCR 法によって調べた。用いた細胞株は、SARG、IOR/OS9、10、14、15、18、MOS、(これらは進行したヒト骨肉種の手術試料から得た)、Saos-2、HOS、MCF-7、T-47D、BT-20、SK-BR3、ZR75-1、MDA-MB-231、Daudi、Jurkat、K562 (これらはアメリカン タイプ カルチャー コレクションより購入)、NZK-K1 (これは 46 才女性の乳癌組織より樹立した)、LK2、QG56、EBC1 及び SBC2 (これらは愛知ガンセンターの成田達彦博士より分与された) である。各細胞株より 2 µg の RNA を抽出し、RT-PCR を 22-30 サイクルかけて増幅した。RB1 遺伝子用のプライマーは公知のプライマーを合成して用いた (Sauerbrey ら、1996 年)。RB1CC1 増幅用プライマー対は配列表・配列番号 19 及び 20 (CC1-S と CC1-AS) の組み合わせを用いた。コントロールとして β2 ミクログロブリンを用いた。これら全ての細胞で RB1CC1 遺伝子の発現は RB1 遺伝子の発現と強く相関した。正常リンパ球 1 例と 6 例の癌細胞 T-47D、MCF7、NZK-K1、Daudi、K562、Jurkat の結果を第 6 図に示した (第 6 図)。

(実施例 7 臓器での本発明の RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現)

ヒトの脳、心臓、骨格筋、大腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺、リンパ球の各非腫瘍組織中に発現している RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子を市販の MTN Blots (Clontech 社製) を用いてノーザンブロット解析によって行った。その結果を第 7 図に示した。心臓及び骨格筋では両遺伝子は強く発現しており、大腸、小腸、肺及びリンパ球では発現は弱かった。しかし、RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現は相関していた。一方マウスの心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、筋肉、腎臓、睪丸の各組織中に発現している Rb1cc1 遺伝子をノーザンブロット解析した。その結果を第 8 図に示した。心臓では 6.2-kb と 6.8-kb の転写産物が強く発現しており、腎臓、肝臓及び筋肉で若干の発現が認められた。睪丸では 6.2-kb の発現が主であり、肺及び脾臓では発現は弱かった(第 7 図、第 8 図)。

(実施例 8 本発明の RB1CC1 遺伝子導入による RB1 遺伝子の発現)

実施例 6 で示した細胞の中で RB1CC1 遺伝子及び RB1 遺伝子の両方が弱い発現レベルであった Jurkat 及び K562 細胞に RB1CC1 遺伝子を外から導入して、RB1 遺伝子の発現レベルの変化を調べた。RB1CC1 分子の完全なコード領域を含む 4.9-kb を pCR3.1-Uni ベクター (Invitrogen 社製) に組み込み、クローニングして RB1CC1 発現ベクター (pCR-RB1CC) を調製した。調製した発現ベクターを K562 及び Jurkat 細胞に組み込み RB1CC1 形質転換細胞を調製した。対照として pCR3.1-Uni ベクターに lac Z 遺伝子を組み込んだものを調製した。親細胞と形質転換細胞 (RB1CC1 遺伝子導入細胞) のそれぞれの RB1CC1 遺伝子と RB1 遺伝子の発現レベルを実施例 6 と同様に操作して調べた。その結果を第 9 図に示した。未転換の細胞及び lac Z 遺伝子を組み込んだ細胞では RB1CC1 遺伝子及び RB1 遺伝子ともに発現は弱いが、

RB1CC1 遺伝子を組み込んだ細胞では RB1CC1 遺伝子はもとより RB1 遺伝子も強く発現されていることが判り、RB1CC1 遺伝子の導入（外来性発現）により RB1 遺伝子の発現も誘導されることが示された（第 9 図）。

5 （実施例 9 本発明の RB1CC1 遺伝子の RB1 遺伝子プロモーター転写活性）

RB1CC1 遺伝子の導入が RB1 遺伝子のプロモーター領域の転写活性を増強制御していることを調べた。約 2-kb の RB1 プロモーター領域の遺伝子をプライマー対、5'-GAA GAT CTT TGA AAT TCC TCC TGC
10 ACC A-3' (Bgl.RbPro-S) と 5'-CCC AAG CTT AGC CAG CGA GCT GTG GAG-3' (Hind.RbPro-AS) で増幅させ、PicaGene Basic ベクター 2（東洋インク製）に組み込んだ。そして、RB1 プロモーターが蛍ルシフェラーゼの発現を支配している pGV-RbPro ベクターを調製した。調製した pGV-RbPro ベクターはさらに、内部コントロールとしてシーパ
15 ンジェルルシフェラーゼ遺伝子をコードする pRL-SV40 で重転換させて、K562 細胞に LIPOFECTAMINE PLUS 試薬（GIBCO 社製）を用いて組み込んだ。48 時間後に東洋インク社製の 2 重ルシフェラーゼ分析システムを用いて分析したところ、RB1CC1 遺伝子を導入した K562 細胞ではコントロールの lac Z を組み込んだ K562 細胞に比べて強いルシフェ
20 ーゼ活性を示し、RB1CC1 遺伝子の導入が RB1 遺伝子プロモーターの転写活性を強めることが判った（第 10 図）。

（実施例 10 原発性乳癌における RB1CC1 遺伝子のローカス (D8S567) でのヘテロ接合性の消失）

25 癌組織の DNA 試料及び同一患者のゲノム DNA を PCR により増幅した試料を尿素変性 8 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

電気泳動後、銀染色により得られた結果を第 11 図に示した。何れの患者でもゲノム DNA では 2 本のバンドが認められ、ヘテロ接合性が保持されているのに対して、5 例の癌組織の DNA で 1 本のバンドしか検出されず、ヘテロ接合性の消失を認めた (第 11 図)。

5

(実施例 11 乳癌における本発明の RB1CC1 遺伝子の変異解析)

実施例 1 で用いた配列番号 6 及び 25 のプライマー対 (CC1-S2 と CC1-AS2) により ELONGASE システム (GIBCO 社製) を用いて増幅した cDNA 試料を、ABI PRISM310 型遺伝子解析装置、及び配列表・
10 配列番号 7 ~ 24 のプライマーを用いて、遺伝子配列を解析することにより RB1CC1 遺伝子の変異を同定した。その結果 35 例の乳癌中 7 例の変異例を確認し、9 種類の変異型を確認した。更にこれを配列番号 38 ~ 52 のプライマーを使って再確認した。その結果を表 2 に示した。

(表 2)

15

20

25

27/1/27.

表 2 原発性乳癌における *RB1CC1* 遺伝子の変異

試料名	ヌクレオチド変異	存在部位 (エキソン)	予測される 影響	ゲノム DNA	<i>RB1CC1</i> 遺伝子の状態		<i>RB1</i> の状態	
					対立遺伝子	蛋白質	LOH	蛋白質
MMK3	c.11_4800del	3-24	Y4fsX4	天然型	複数ヘテロ結合欠損	(-)	(-)	↓↓
	c.325_1585del	5-11	P109fsX122					
MMK6	c.10_4798del	3-24	Y4fsX48	天然型	複数ヘテロ結合欠損	(-)	(-)	(-)
	c.1233_4633del	9-23	D411fsX431					
MMK1	c.957_4785del	7-24	N319fsX368	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	↓↓
MMK15	c.1635_4719del	12-24	S545fsX557	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	(-)
MMK31	c.212_4188del	5-24	171fsX111	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	(-)
MMK38	c.241_4621del	5-22	C81fsX99	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	↓↓
MMK40	c.591_4678del	7-23	S197fsX212	天然型	ヘテロ接合性消失	(-)	(-)	↓↓

(-): absent, ↓↓: significantly decreased.

LOH: ヘテロ接合性消失

(実施例 1 2)

実施例 1 1 で解析した試料のうち RB1CC1 遺伝子に変異の求められた MMK6 と認められなかった MMK29 について PCR 産物を分析した結果とそれに対応する遺伝子配列解析結果を第 1 2 図に示した。その結果、
5 変異のない MMK29 では 4.9-kb の遺伝子が発現されているのに対して変異のある MMK6 では 4.9-kb の発現は認められず断片遺伝子 (1456bp と 98bp) の発現が認められた (第 1 2 図)。

(実施例 1 3 ウェスタンブロットによる解析)

10 実施例 1 1 で解析した試料のうち RB1CC1 遺伝子に変異を認めた 3 種の癌 (MMK6、MMK40、MMK38) 及び変異を認めなかった 2 例 (MMK12、MMK29) について、新規蛋白質 RB1CC1 と RB1 蛋白質の発現をウェスタンブロットで確認した。抽出蛋白質を 5%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、PVDF メンブランに転写し、実施例 4 で調製した
15 抗ヒト RB1CC1 抗血清 (α -RB1CC-642) を反応させた。RB1 蛋白質は抗 RB1 モノクローナル抗体 (G3-245;PharMingen 社製) を反応させた。反応後、検出は ECL 試薬 (Amersham 社製) で行った。その結果を第 1 3 図に示した。変異のない MMK12 と MMK29 においては 180kDa の分子量を持つ新規蛋白質 RB1CC1 と 110~116kDa の RB1 蛋白質の両
20 蛋白質が発現しているのに対して、変異のある 3 例では何れも両蛋白質の発現は認められなかった (第 1 3 図)。

(実施例 1 4 免疫組織染色)

実施例 1 1 で解析した試料のうち RB1CC1 遺伝子に変異を認めた 2
25 種の癌 (MMK3、MMK6) 及び変異を認めなかった 1 例 (MMK12) の免疫組織染色を行った。反応させる抗体は実施例 1 3 と同じ抗体を用い、

それぞれの癌試料から得たパラフィン固定ブロックより調製した組織切片に抗体を反応させた。第 1 4 図に示したように新規蛋白質 RB1CC1 と RB1 蛋白質の発現レベルは相関しており、RB1CC1 遺伝子に変異を認めた 2 種の癌 (MMK3、MMK6) では変異を認めなかった 1 例 (MMK12) よりも明らかにその発現レベルは低下していることが確認された (第 1 4 図)。

(実施例 1 5)

実施例 1 4 と同様に操作し、54 例の原発性乳癌組織を免疫組織染色により検査したところ、15%にあたる 8 例で RB1CC1 蛋白質が検出されなかった。そして、これら全てで RB1 蛋白質の発現が欠如しているか或いは有意に低下していた。

一方、RB1CC1 蛋白質を発現している 46 例では、45 例において RB1 蛋白質が同時に発現していた。この RB1 蛋白質の発現を免疫組織染色の染色指標 (1000 個以上の細胞のうち染色される細胞の数の割合を%で表したもの) で RB1CC1 陽性群と陰性群で比較すると、RB1CC1 陽性群が $78.6 \pm 13.9\%$ に対して陰性群は $13.6 \pm 12.1\%$ と RB1CC1 の発現と正の相関を示していた (第 1 5 a 図)。一方、Ki-67 の免疫組織染色をマウスモノクローナル抗体 (NCL-Ki-67-MMI、ノボカストラ社製) を用いて行ったところ、その染色指標は RB1CC1 陽性群で $20.3 \pm 12.8\%$ に対して、陰性群では $65.0 \pm 12.2\%$ と明らかに RB1CC1 の発現と逆相関が認められた (第 1 5 b 図)。

これらのことから、RB1CC1 蛋白質の発現が抑制されている癌では、細胞増殖のマーカーである Ki-67 が多量に発現されており、癌細胞の増殖が盛んであることを示している。このように RB1CC1 蛋白質と Ki-67 の両者を組み合わせて検査することにより、癌の診断に有用であること

が判った。

産業上の利用の可能性

- 本発明の新規遺伝子（RB1CC1 遺伝子）及びその蛋白質（RB1CC1）
- 5 を検査することにより、癌細胞の増殖及び癌の診断に有用な情報を提供
できる。

10

15

20

25

請 求 の 範 囲

1. ヒト又は動物の細胞の核に存在し、転写因子機能及び／又はレチ
ノブラストーマ遺伝子（RB1 遺伝子）或いはその遺伝子産物の発現を誘
導しうる機能を有する蛋白質又はポリペプチド。
2. 請求の範囲第 1 項記載のヒト蛋白質が下記の群より選ばれるポリ
ペプチド又は蛋白質；（1）配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列で
示されるポリペプチド又は蛋白質、（2）前記のポリペプチド又は蛋白質
10 のアミノ酸配列の少なくとも 5 個のアミノ酸配列を含有するポリペプチ
ド、（3）前記のポリペプチド又は蛋白質と少なくとも約 70% のアミノ
酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は蛋白質、（4）及び前記（1）
から（3）のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列において 1 ないし
数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加などの変異あるいは誘発変異を有
15 するポリペプチド又は蛋白質。
3. 請求の範囲第 1 項記載の動物蛋白質がマウス由来の蛋白質であり、
下記の群より選ばれるポリペプチド又は蛋白質；（1）配列表の配列番号
2 に記載のアミノ酸配列で示されるポリペプチド又は蛋白質、（2）前記
20 のポリペプチド又は蛋白質のアミノ酸配列の少なくとも 5 個のアミノ酸
配列を含有するポリペプチド、（3）前記のポリペプチド又は蛋白質と少
なくとも約 70% のアミノ酸配列上の相同性を有するポリペプチド又は
蛋白質、（4）及び前記（1）から（3）のポリペプチド又は蛋白質のア
ミノ酸配列において 1 ないし数個のアミノ酸の欠失、置換又は付加など
25 の変異あるいは誘発変異を有するポリペプチド又は蛋白質。

4. 請求の範囲第1項～第3項に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする核酸又はその相補鎖。
5. 請求の範囲第3項に記載の核酸又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする核酸。
6. 配列表の配列番号3～4に記載の核酸又はその相補鎖の塩基配列のうち少なくとも15個の連続した塩基配列で示される核酸であって、該核酸の転写によって発現されるポリペプチドが請求の範囲第1項～第3項記載のポリペプチドである核酸。
7. 請求の範囲第4項～第6項のいずれか1項に記載の核酸を含有する組換えベクター。
8. 請求の範囲第7項の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
9. 請求の範囲第8項の形質転換体を培養する工程を含む、請求の範囲第1項～第3項に記載のポリペプチド又は蛋白質の製造方法。
10. 請求の範囲第4項～第6項に記載の核酸又はその相補鎖とストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションする配列表の配列番号5～132に記載の核酸プライマー。
11. 請求の範囲第1項～第3項に記載のポリペプチド又は蛋白質を免疫学的に認識する抗体。

- 1 2. 請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質の
転写因子活性及び／又は RB1 遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害も
しくは増強する化合物のスクリーニング方法であって、請求の範囲第 1
項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質、請求の範囲第 1 1 項に記
5 載の抗体のうち、少なくともいずれか 1 つを用いることを特徴とするス
クリーニング方法。
- 1 3. 請求の範囲第 4 項もしくは第 6 項に記載の核酸と相互作用して
該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物のスクリーニング方法であ
10 って、請求の範囲第 4 項～第 6 項のいずれか 1 項に記載の核酸、請求の
範囲第 7 項に記載のベクター、請求の範囲第 8 項に記載の形質転換体、
請求の範囲第 1 0 項に記載の核酸プライマーのうち少なくともいずれか
1 つを用いることを特徴とするスクリーニング方法。
- 15 1 4. 請求の範囲第 1 2 項又は第 1 3 項に記載のスクリーニング方法
でスクリーニングされる化合物。
- 1 5. 請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質の
転写因子活性及び／又は RB1 遺伝子の発現を誘導しうる機能を阻害も
20 しくは増強する化合物。
- 1 6. 請求の範囲第 4 項～第 6 項のいずれか 1 項に記載の核酸と相互
作用して該核酸の発現を阻害もしくは増強する化合物。
- 25 1 7. 請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質、
請求の範囲第 4 項～第 6 項のいずれか 1 項に記載の核酸、請求の範囲第

7 項に記載のベクター、請求の範囲第 8 項に記載の形質転換体、請求の範囲第 10 項に記載の核酸プライマー、請求の範囲第 11 項に記載の抗体、又は請求の範囲第 14 項～第 16 項のいずれか 1 項に記載の化合物のうち、少なくともいずれか 1 つを含有することを特徴とする、抗がん剤の治療に抵抗性である多剤耐性の治療に用いる医薬組成物。

10 18. 請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質の発現又は活性に関連した疾病の検査診断方法であって、試料中の (a) 該ポリペプチド又は蛋白質をコードしている核酸、及び／又は (b) 該ポリペプチド又は蛋白質をマーカーとして分析することを含む検査診断方法。

15 19. 癌細胞の検査方法又は癌の診断方法である請求の範囲第 18 項の検査診断方法。

20 20. 請求の範囲第 11 項に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質の全部又は一部の発現、増加、減少、欠損等を検査する請求の範囲第 18 項又は第 19 項に記載の方法。

25 21. 請求の範囲第 10 項に記載の核酸プライマーの少なくとも何れかの 1 つを用いて請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子を増幅させる工程を経て、請求の範囲第 1 項～第 3 項に記載のポリペプチド又は蛋白質をコードする遺伝子の全部又は一部の発現、変異、欠損又は挿入等を検査する請求の範囲第 18 項又は第 19 項に記載の方法。

22. 癌抑制遺伝子レチノブラストーマ遺伝子 (RB1 遺伝子) 或いはその遺伝子産物 (RB1 蛋白質) の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、欠損又は挿入等进行检查することを組み合わせることを特徴とする請求の範囲第18項～第21項に記載の方法。

5

23. 多剤耐性遺伝子、(MDR1 遺伝子) の或いはその遺伝子産物 (MDR1 蛋白質：P-糖蛋白質) の全部又は一部の発現、増加、減少、変異、欠損又は挿入等进行检查することを組み合わせることを特徴とする請求の範囲第18項～第22項に記載の方法。

10

24. 細胞増殖マーカー、Ki-67 蛋白質、の全部又は一部の発現、増加、減少等进行检查することを組み合わせることを特徴とする請求の範囲第18項～第23項に記載の方法。

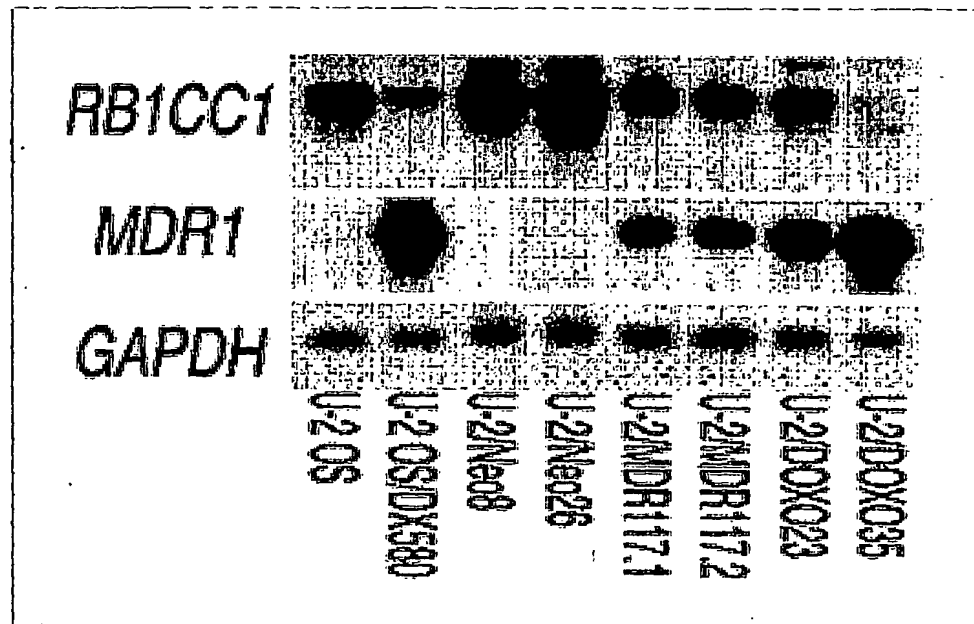
15 25. 請求の範囲第23項記載の方法を用いる癌細胞の薬剤感受性进行检查する方法。

26. 請求の範囲第18項～第25項に記載の方法に用いる検査診断試薬及びキット。

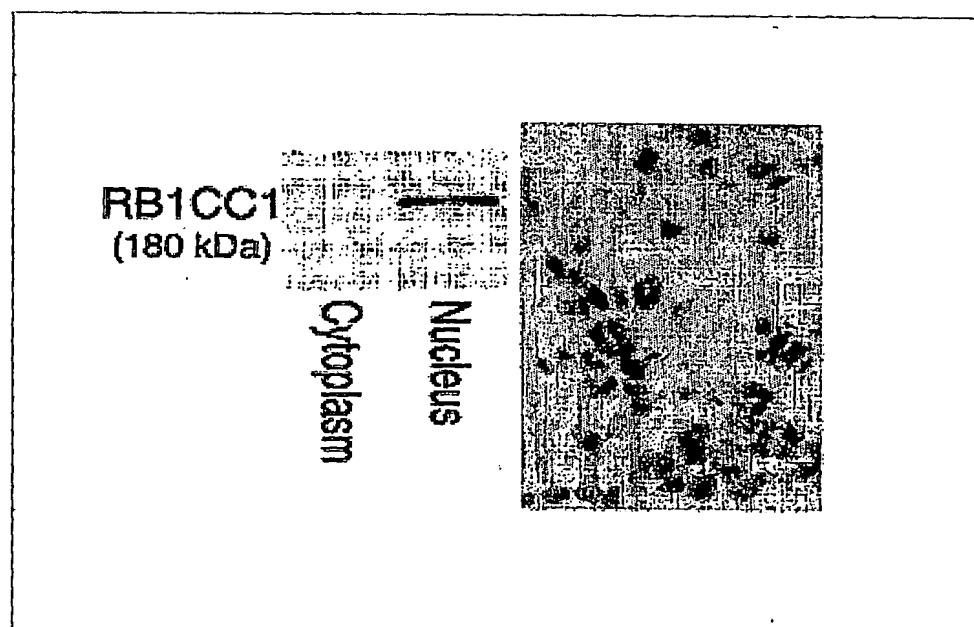
20

25

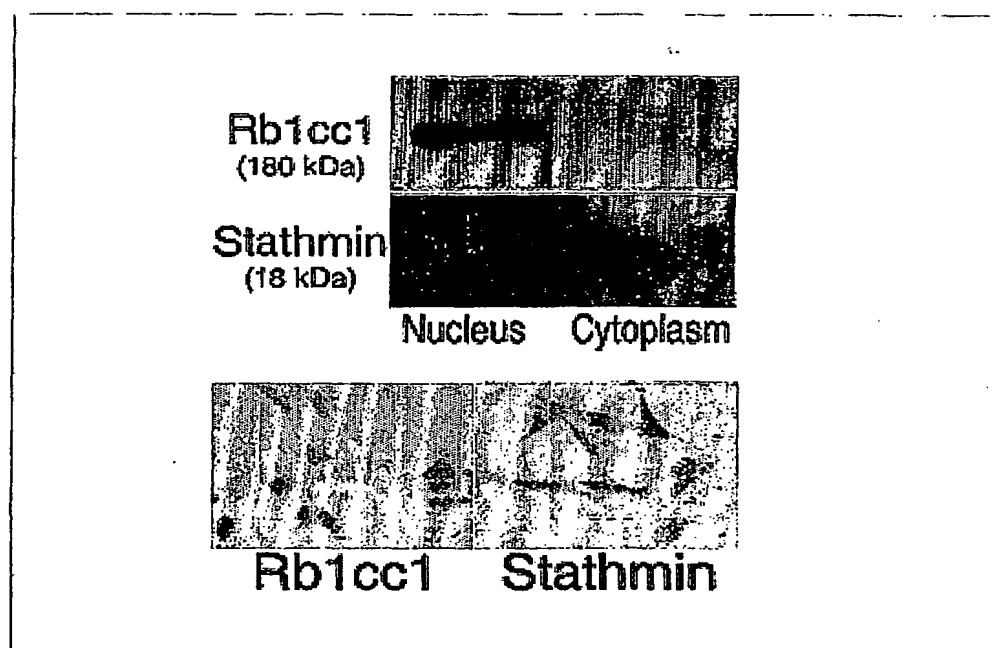
第 1 図



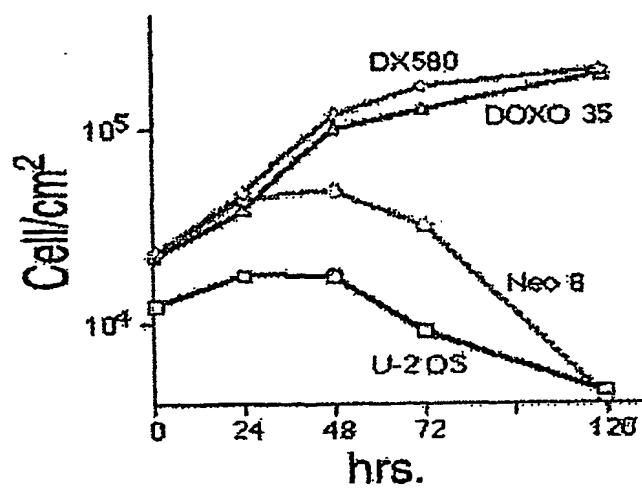
第 2 図



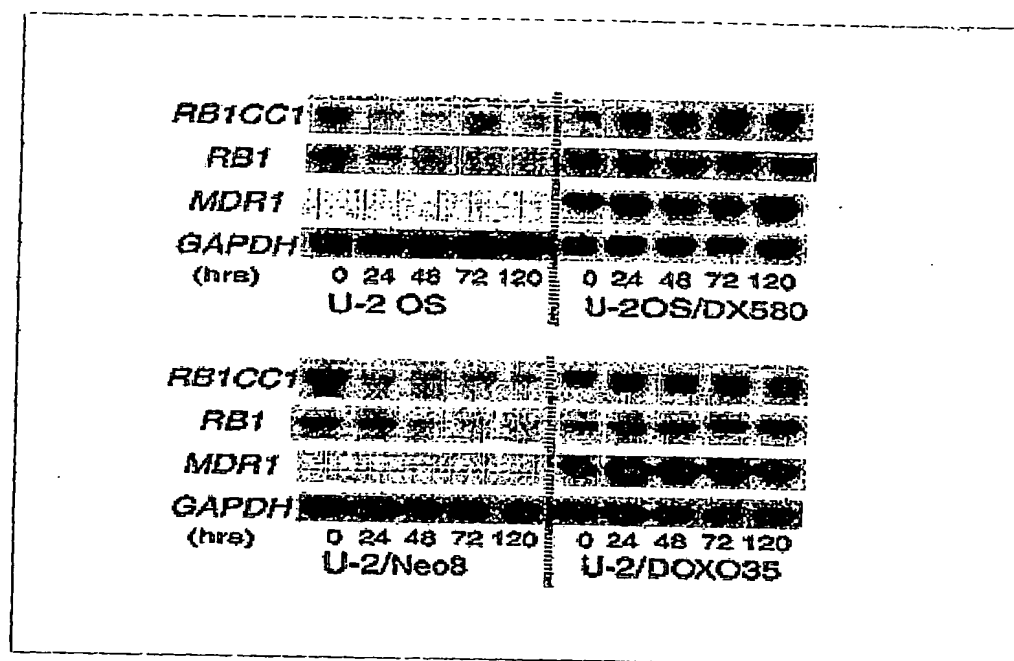
第3図



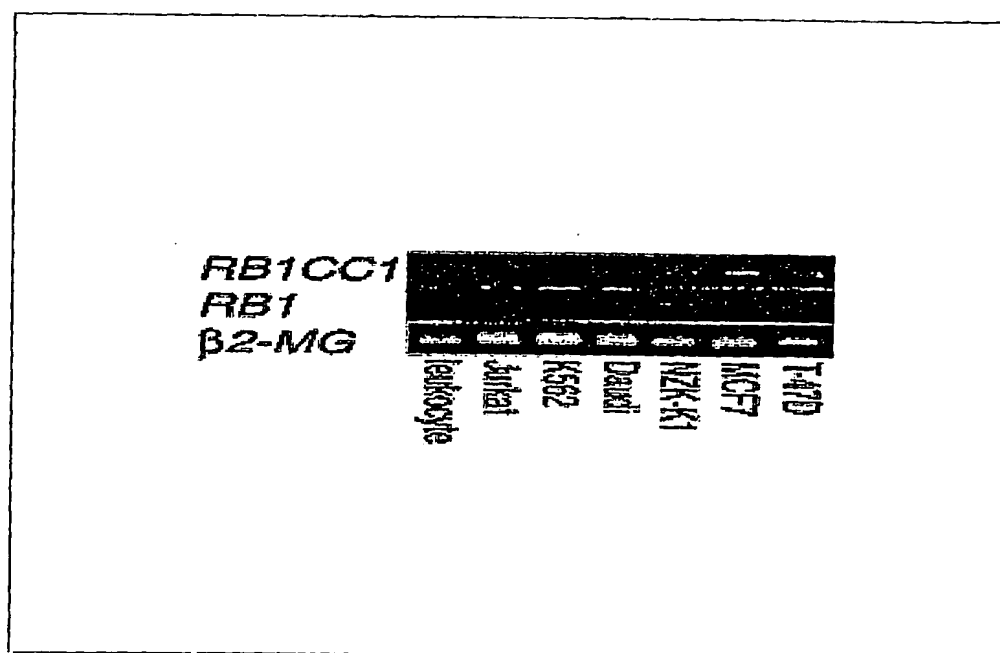
第4図



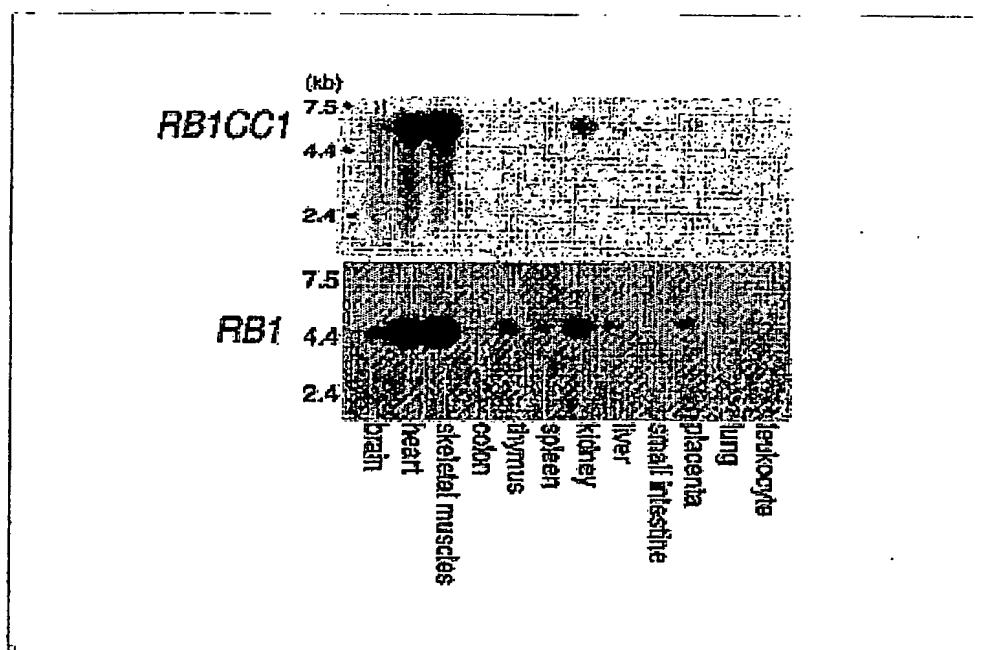
第5図



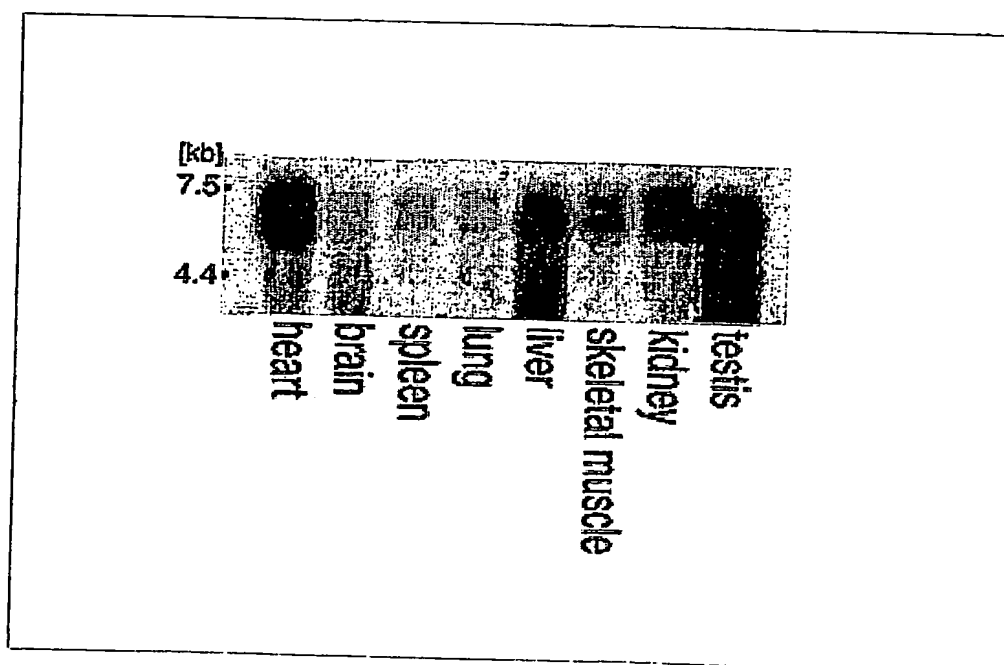
第6図



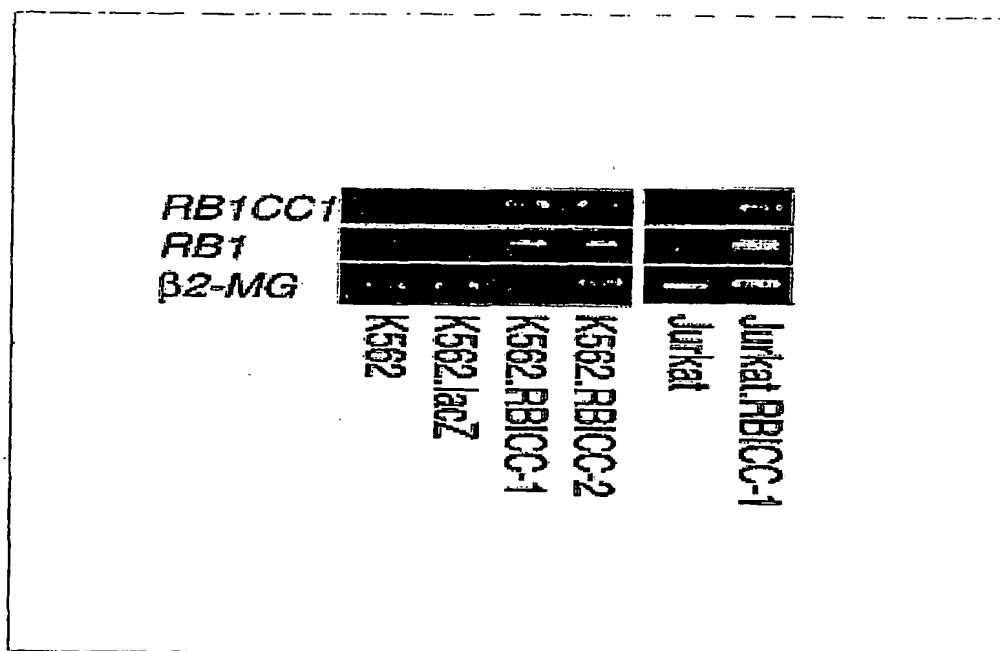
第7図



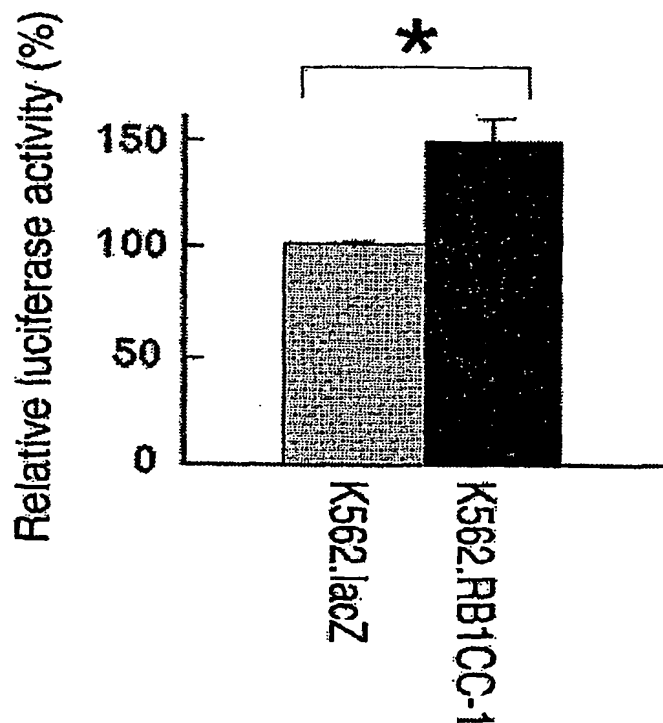
第8図



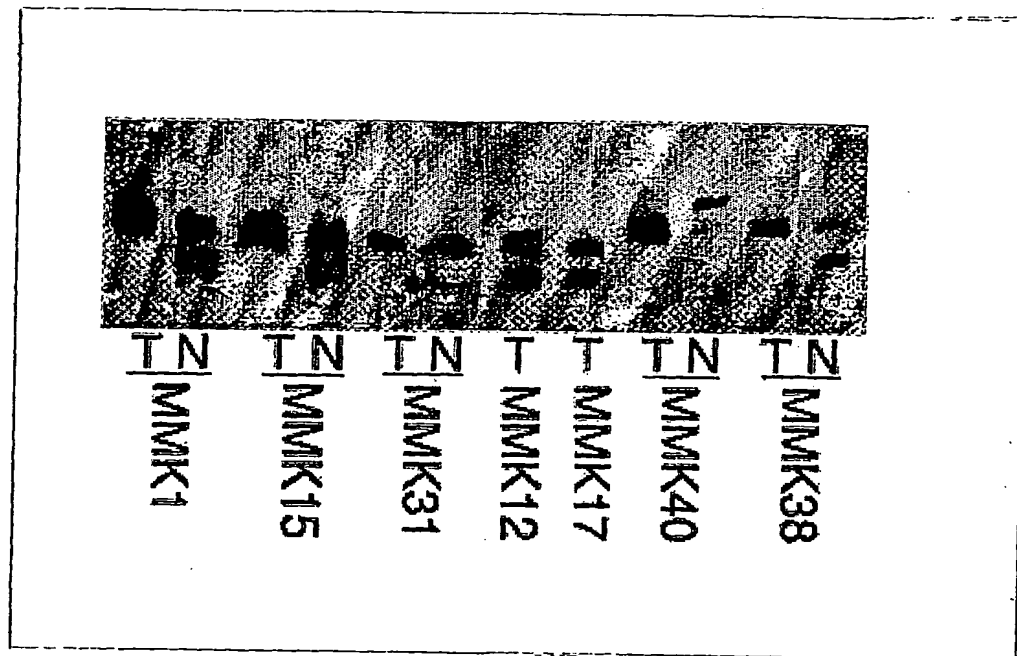
第9図



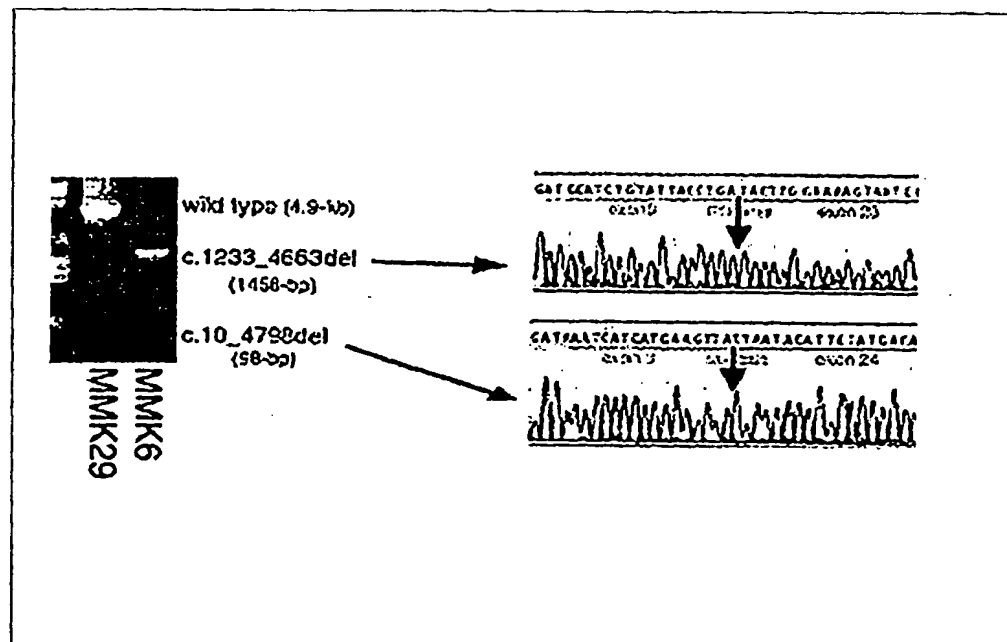
第10図



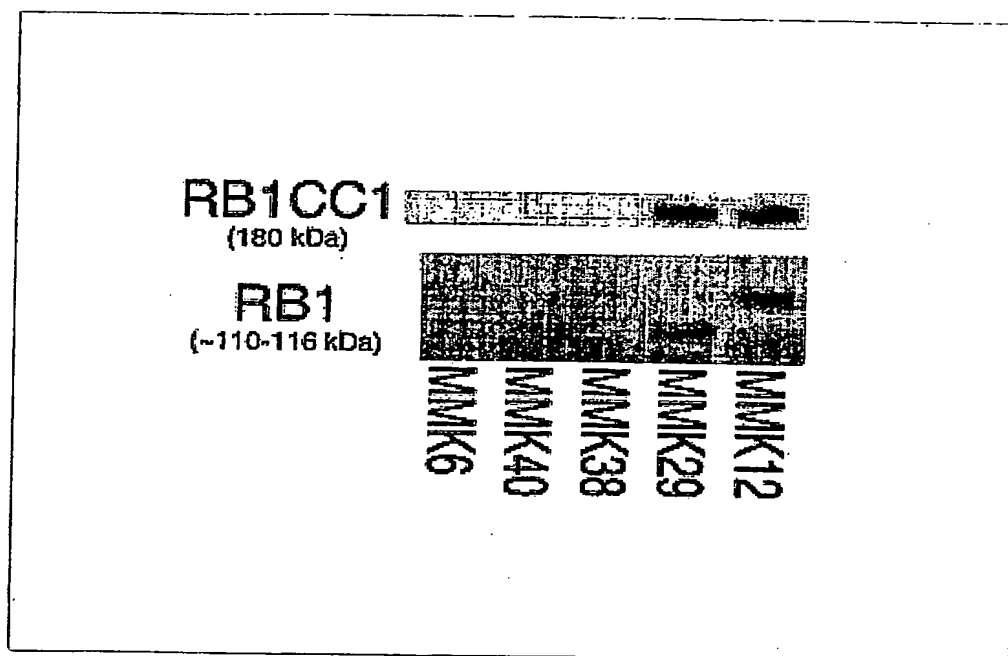
第 1 1 図



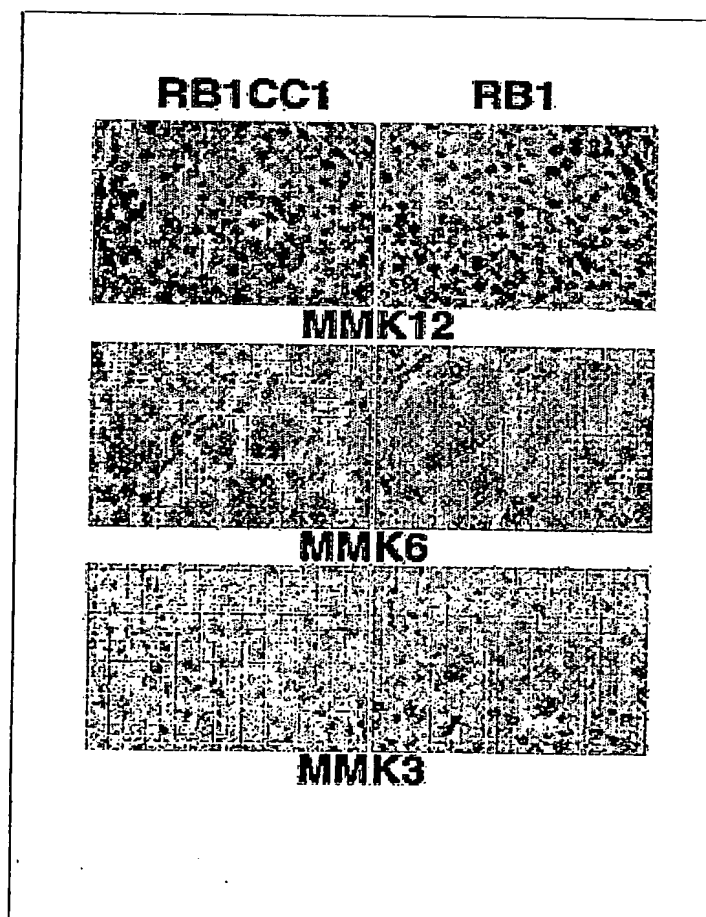
第 1 2 図



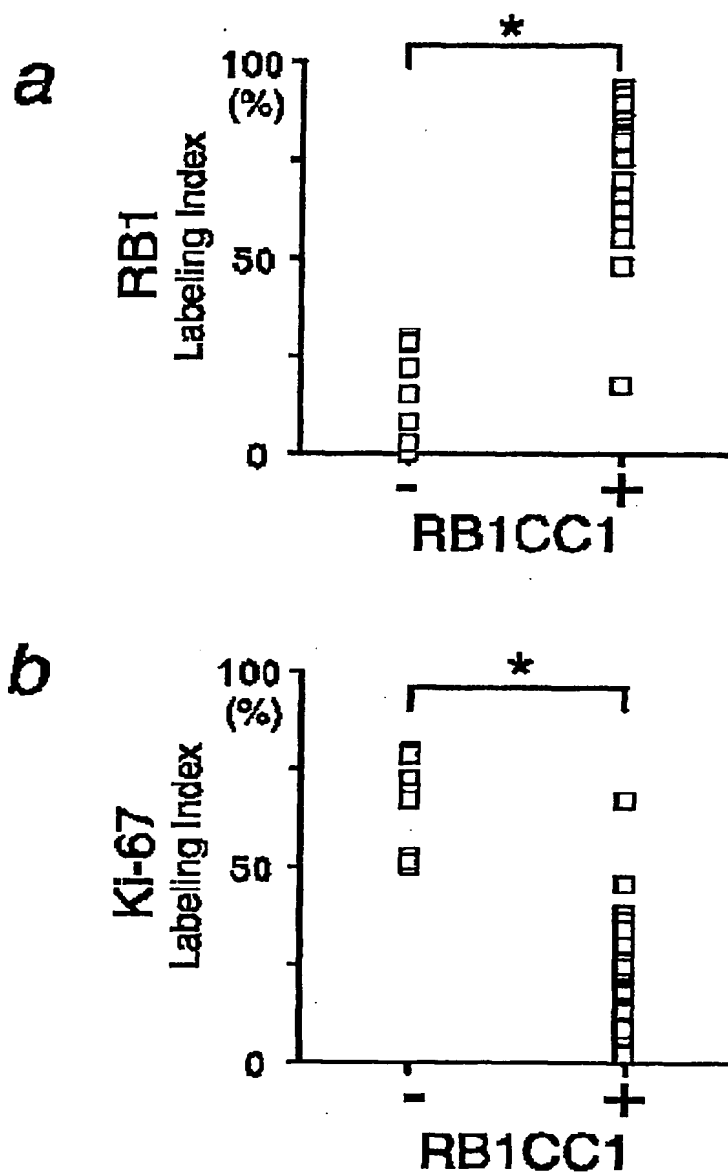
第 1 3 図



第 1 4 図



第 15 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.